

末梢血免疫能およびゲノム情報を利用した豚マイコプラズマ性肺炎に対する抗病性育種手法の開発

著者	岡村 俊宏
号	53
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1159号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122794

おかむら としひろ

氏 名（本 籍 地） 岡 村 俊 宏

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農博第 1159 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 28 年 9 月 26 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

研 究 科 ， 専 攻 東北大学大学院（博士課程）農学研究科資源生物科学専攻

論 文 題 目 末梢血免疫能およびゲノム情報を利用した豚マイコプラズマ性肺炎に対する
抗病性育種手法の開発

博士論文審査委員 （主査）教 授 佐 藤 正 寛

教 授 麻 生 久

准教授 北 澤 春 樹

教 授（寄附講座） 鈴 木 啓 一

論文内容要旨

末梢血免疫能およびゲノム情報を利用した豚マイコプラズマ性肺炎に対する抗病性育種手法の開発

東北大学大学院農学研究科
資源生物科学専攻

岡村 俊宏

指導教員

佐藤 正寛 教授

緒言

飼育頭数の大規模化と飼育密度の上昇によって、養豚産業の呼吸器病による経済的損失が深刻になっている (William 2012)。特に、豚呼吸器複合感染症 (porcine respiratory disease complex; PRDC) は、複数の病原体が複合的に感染して重篤な呼吸器疾患を発症し、斃死や発育遅延を引き起こす。中でも、*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) は、肺胞線毛上皮へ付着し、マイコプラズマ性肺炎 (mycoplasmal pneumonia of swine; MPS) を発生させる。MPS を発生した個体は肺の免疫能力が低下し、他の porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) のような病原体に感染し易くなることが報告されており (Thacker *et al.* 1999)、PRDC の主要な原因の一つとされている (Thacker & Minion 2012)。Mhp 感染に対する対策として、ワクチンの接種や薬剤投与、飼養環境改善などが行われているが、必ずしもそれらが有効とは限らず、未だ Mhp の発生率は高いままである (Simionatto *et al.* 2013)。また、EU における飼料への抗菌剤添加の禁止や食肉への薬剤残留の危険性も考えられることから、ワクチンや薬剤、飼養環境改善等による対策の他に、遺伝的に病原体への抵抗性の高い集団を育種することが必要である。

宮城県畜産試験場では MPS に高い抵抗性を示す豚ランドレース集団を造成した (Kadowaki *et al.* 2012)。この集団は、1 日平均増体重および背脂肪厚 (生産形質) に加え、MPS 病変スコアと免疫形質である末梢血コルチゾール濃度を改良形質として育種され、それぞれの推定育種価から算出した総合推定育種価によって選抜が実施された。その結果、生産形質の改良と同時に、MPS 病変スコアを遺伝的に減少させることに成功した。

一方、病変形質の改良には、1) 測定に必要なと畜に係るコストが大きいこと、2) 選抜候補個体から直接測定できないこと、3) 一般に遺伝率が低いことなどから、これまでの豚における改良対象形質に比べて改良の効率が低い。そこで、このような病変形質を効率よく改良する手法の開発が必要である。

その一つは、改良のターゲットとなる病変形質と関連性のある形質を、選抜の代替形質または病変形質の遺伝的能力推定の相関形質として用いる手法である。直接測定することが困難な形質や、測定にコストがかかる形質を改良する場合には、改良したい形質と相関があり、かつ測定が比較的容易な形質を代替の選抜指標として改良に用いる方法は以前より考案されてきた (Searle 1965, Falconer and Mackay. 1996)。また、遺伝的に関連性のある形質を選抜候補の血縁個体より収集し、その情報を用いて改良したい形質の育種価を推定する (Henderson and Quass, 1976) ことにより、推定精度の向上が期待できる (reviewed by Ducrocq 1994)。

もう一つは、病変形質を制御するゲノム領域の情報をもとに選抜する手法である。DNA マーカーの分析技術の発達によって、1990 年代から量的形質に影響する遺伝子座位 (Quantitative trait loci; QTL) の位置を特定する研究が行われてきた。家畜の QTL をまとめたデータベースである QTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>) には、豚に関して 14,479 個の QTL が報告されており、その対象も 592 形質に渡っている (2016 年 4 月現在)。QTL または QTL の近傍に存在する DNA マーカーの多型に基づく選抜は marker-assisted selection (MAS) として知られ、その原理は古くより考案されている (Smith 1967)。この方法は測定が高コストな形質 (例えば、メタン産生量や飼料要求性、抗病性) では、影響する遺伝子を特定し、その遺伝子型にもとづいた選抜により、効率的な改良が可能になると考えられている (Goddard and Hayes 2009)。

そこで本研究では、前述の MPS 病変スコアを減少させる方向に育種されたランドレース種集団を供試動物として、MPS 病変スコアを効率的に改良する手法を 2 つのアプローチから開発した。まず、末梢血の免疫能 (免疫形質) を利用して MPS 病変スコアを改良するための有用形質を探索するとともに、その効率的な利用方法について検討した。次

に、MPS 病変スコアに影響するゲノム領域を探索し、そのゲノム情報による MPS 病変スコアの改良およびその利用方法について検討した。

第 1 章 豚の疾病に関連する免疫形質の探索とその利用方法

本章では、免疫形質を利用した病変形質の効率的な改良手法を開発することを目的とした。前述の豚ランドレース種集団から末梢血免疫形質を測定し、病変形質と免疫形質の遺伝的特性と遺伝的関連性を明らかにするため、その遺伝的パラメーターを推定した。次に、MPS 病変スコアの選抜に有用な免疫形質の探索とその利用法について、コンピューターシミュレーションによって検討した。供試動物は宮城県畜産試験場にて 2002 年から 2008 年までに系統造成された豚ランドレース種集団の基礎世代から第 5 世代を用いた。この集団より MPS 病変スコアと、7 週齢時に採血した末梢血から 5 つの免疫形質（食細胞活性（PA7wk）、補体別経路活性（CAPA7wk）、総白血球数（WBC7wk）、顆粒球リンパ球比率（RGL7wk）、コルチゾール濃度（CORT7wk））を、また体重 105kg 到達時に採血した末梢血から 6 つの免疫形質（食細胞活性（PA105）、補体別経路活性（CAPA105）、総白血球数（WBC105）、顆粒球リンパ球比率（RGL105）、コルチゾール濃度（CORT105）、羊赤血球特異的抗体産生能（AP））を測定した。生産形質として一日平均増体重（ADG）と背脂肪厚（BF）を測定し、これらの遺伝率および遺伝相関を推定した。その結果、MPS 病変スコアの遺伝率は 0.07 と低い値が推定され（表 1）、直接選抜による改良は困難であることが示唆された。また、MPS 病変形質との遺伝相関が高い形質は、PA7wk、CAPA105、RGL105 および CORT105 であった（表 1）。

この分析で推定された値をもとに、系統造成を模したコンピューターシミュレーションによって、PA7wk、CAPA105、RGL105 および CORT105 のうち、MPS 病変スコアの改良に最適な免疫形質を探索し、その効果について検討した。その結果、PA7wk を利用して推定した MPS 病変スコアの育種価を利用した 2 段階選抜において、MPS 病変ス

コアの改良量が最も大きくなり、免疫形質を利用しない場合の改良（-0.80、表 2）に比べて約 3 倍の改良量であった（表 2）。PA7wk は、①MPS 病変スコアと高い負の遺伝相関（-0.67）があること（表 1）、②遺伝率の推定値が 0.15 と MPS 病変スコアの約 2 倍であること（表 1）、③7 週齢時の早い時期に測定可能であるため 2 段階選抜の 1 回目で利用可能であることから、MPS 病変スコアの改良に最も有用であることが明らかとなった。

さらに、MPS 病変スコアを測定しない場合の改良についても検討した。その結果、PA7wk を利用して推定した MPS 病変スコアの育種価を利用した 2 段階選抜において、MPS 病変スコアの改良量は-1.89 となり、免疫形質を利用しない場合の改良に比べて大きい改良量が得られた。そのため、MPS 病変スコアを測定する代わりに PA7wk を測定することによって、低コストで効率的な改良の可能性が示唆された。

また、同様に、PA7wk を利用して推定した MPS 病変スコアの育種価を利用した 2 段階選抜は、生産形質への悪影響の低減や近交度の抑制が可能であること（表 3）、選抜によって MPS 病変スコアの表型値が得にくくなった場合でも持続的に改良できることが明らかとなった（表 4）。

第 2 章 豚の疾病に関連するゲノム領域の探索とその利用方法

本章では、MPS 病変スコアに影響するゲノム領域の探索、およびそのゲノム情報の利用による MPS 病変スコアの改良の効率化について検討した。第 1 章で測定した形質を対象とし、全常染色体上にマイクロサテライト（MS）マーカーを配置してその QTL 領域を推定した。その結果、豚 2 番染色体（SSC2）において MPS 病変スコアに関連する QTL が検出された。また、先行研究によって有力な候補遺伝子まで特定されている血中コルチゾール濃度の QTL と同じ領域に CORT105 の QTL が検出され、本研究の妥当性が示唆された。次に、SSC2 の MPS 病変スコアが検出された領域において MS マーカー

を追加し、QTL の候補領域を SSC2 の 18~21Mb 周辺まで絞り込んだ。さらに、この領域に MS マーカーと一塩基多型 (SNP) マーカーを開発し、相関解析を行った結果、SNP マーカー ALGA0012286 が最も有意性の高い ($P < 0.004$) マーカーであることが示された。この SNP マーカーの相加的遺伝子効果と優性効果はそれぞれ 1.12、0.36 であり、この SNP が説明する遺伝分散は、全遺伝分散の 29.0% に相当した。以上のことから、この SNP マーカーが MPS 病変スコアを効率的に改良できるマーカーであることが示唆された。また、この SNP マーカーは SSC2 の 19Mb 付近であり、CD82 をエンコードしている領域のわずかに下流であった。CD82 は細胞の多様なプロセス (例えば、活性化や分化、運動性、付着、シグナリング、融合、転移など) を調節しているテトラスパニンファミリー (reviewd in Yanez-Mo *et al.* 2009) の一つであり、CD63 と class II ヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) と複合体を形成し、class II MHC の成熟後期において、重要な役割を果たしていることが示唆されている (Hammond *et al.* 1998)。そのため、CD82 が Mhp を抗原として提示するプロセスに関与している可能性があり、CD82 は MPS 病変スコアに関する有力な候補遺伝子として考えることができる。

次に、コンピューターシミュレーションによって、MPS 病変スコアの効率的な改良方法について検討した。ALGA0012286 を QTL と仮定し、そのゲノム情報 (QTL の遺伝子型値) を利用した選抜は、BLUP 法から得られる推定育種価を用いた選抜方法よりも、選抜の初期において遺伝的改良量が大きく、5~7 世代で改良が実施される豚の系統造成においては、有用であることが明らかとなった (図 1)。また、ゲノム情報を利用した予備選抜と、推定育種価を用いた本選抜を組み合わせることで、MPS 病変スコアの改良量が最大となり (図 2)、MPS 病変スコアを効率的に改良できる手法であることが明らかになった。

総括

以上のように、本研究では2つのアプローチから MPS 病変スコアを効率的に改良する手法を開発した。免疫形質を利用した手法では、7 週齢時の食細胞活性を利用した MPS 病変スコアの推定育種価による 2 段階選抜により、MPS 病変スコアを最も効率的に改良できることが明らかとなった。また、ゲノム情報を利用した選抜では、繰り返し選抜の初期において、推定育種価による選抜より MPS 病変スコアの改良効率が良く、豚の系統造成において有用であることが明らかとなった。MPS 病変スコアは改良が難しい形質であることから、MPS に対する抵抗性を高める集団を育種することは困難である。しかし、本研究の結果を活用することで、今後の抗病性育種を効率的に進めることが可能となる。また、MPS に限らず、他の疾病に関連する形質等、改良しにくい形質の改良においても、免疫形質等関連形質およびゲノム情報を利用したアプローチによって改良を効率化することができるものと考えられる。本研究の結果は、豚の抗病性育種ひいては養豚産業全体に渡って有用である。

表 1 各形質の遺伝率および選抜形質間の遺伝相関

形質 ¹	平均値	標準偏差	遺伝率	遺伝相関 ²		
				ADG	BF	MPS 病変スコア
ADG	862.1	99.2	0.60	0.60	0.23	0.00
BF	22.2	3.5	0.66	0.23	0.66	-0.01
MPS 病変スコア	2.9	5.1	0.07	0.00	-0.01	0.07
PA7wk	4.55	2.39	0.15	0.08	-0.42	-0.67
CAPA7wk	0.37	0.15	0.11	-0.05	0.16	0.07
WBC7wk	1.96	0.44	0.31	-0.04	-0.07	0.24
RGL7wk	0.73	0.30	0.03	0.57	-0.39	-0.09
CORT7wk	2.5	1.3	0.22	-0.31	-0.58	-0.11
PA105	4.3	2.9	0.18	0.17	-0.30	-0.36
CAPA105	0.4	0.2	0.09	-0.07	-0.05	0.66
WBC105	1.87	0.35	0.23	0.13	-0.03	-0.29
RGL105	0.77	0.35	0.06	0.21	0.41	-0.66
CORT105	1.21	0.99	0.19	0.29	0.04	0.49
AP	68.84	79.86	0.18	-0.26	-0.13	-0.23

¹ ADG: 一日平均増体重; BF: 背脂肪厚; MPS: マイコプラズマ性肺炎病変スコア;
CORT: 血中コルチゾール濃度; AR: 萎縮性鼻炎病変スコア; PA: 食細胞活性; CAPA: 補
体第二経路活性; WBC: 総白血球数; RGL: 顆粒球リンパ球比率; AP: 抗体産生能. 形質名
の後ろは、7 週齢時の場合“7wk”、105kg 到達時の場合“105”を表す。

² 遺伝相関の標準誤差：0.04～0.51

表 2 各免疫形質を用いた MPS 病変スコアの選抜開始後 5 世代の改良量

予備選抜 ¹	本選抜 ²	MPS 病変スコアの改良量
-	なし	-0.80
-	PA7wk ³	-1.48
-	CAPA105 ³	-1.42
-	RGL105 ³	-1.37
-	CORT105 ³	-1.38
PA7wk	PA7wk	-2.31

¹ 予備選抜時の MPS 病変スコアの育種価推定に用いた免疫形質、-は選抜がランダムに実施されたことを示す。

² 本選抜時の MPS 病変スコアの育種価推定に用いた免疫形質。

³ 形質名は表 1 説明を参照。

表 3 2 段階選抜による MPS 病変スコアの選抜開始後 5 世代の改良量および近交係数

		免疫形質	
		なし	PA7wk ¹
改良量	ADG ¹	-1.69	7.08
	BF ¹	0.59	-0.48
近交係数		20.2%	15.3%

¹ 形質名は表 1 を参照。

表 4 2 段階選抜による MPS 病変スコアの選抜開始後 5 世代の MPS 病変スコアの改良量

		免疫形質	
設定条件	平均 ¹	なし	PA7wk ²
0 に変換 ³	2.9	-1.23	-2.33
	1.45	-1.21	-2.31
	0	-1.17	-2.31
	-1.45	-1.07	-2.27

¹ 平均：MPS 病変スコアを発生させる際に用いた平均値。

² 形質名は表 1 を参照。

³ 発生させた表型値が負になった値をすべて 0 に置換した場合。

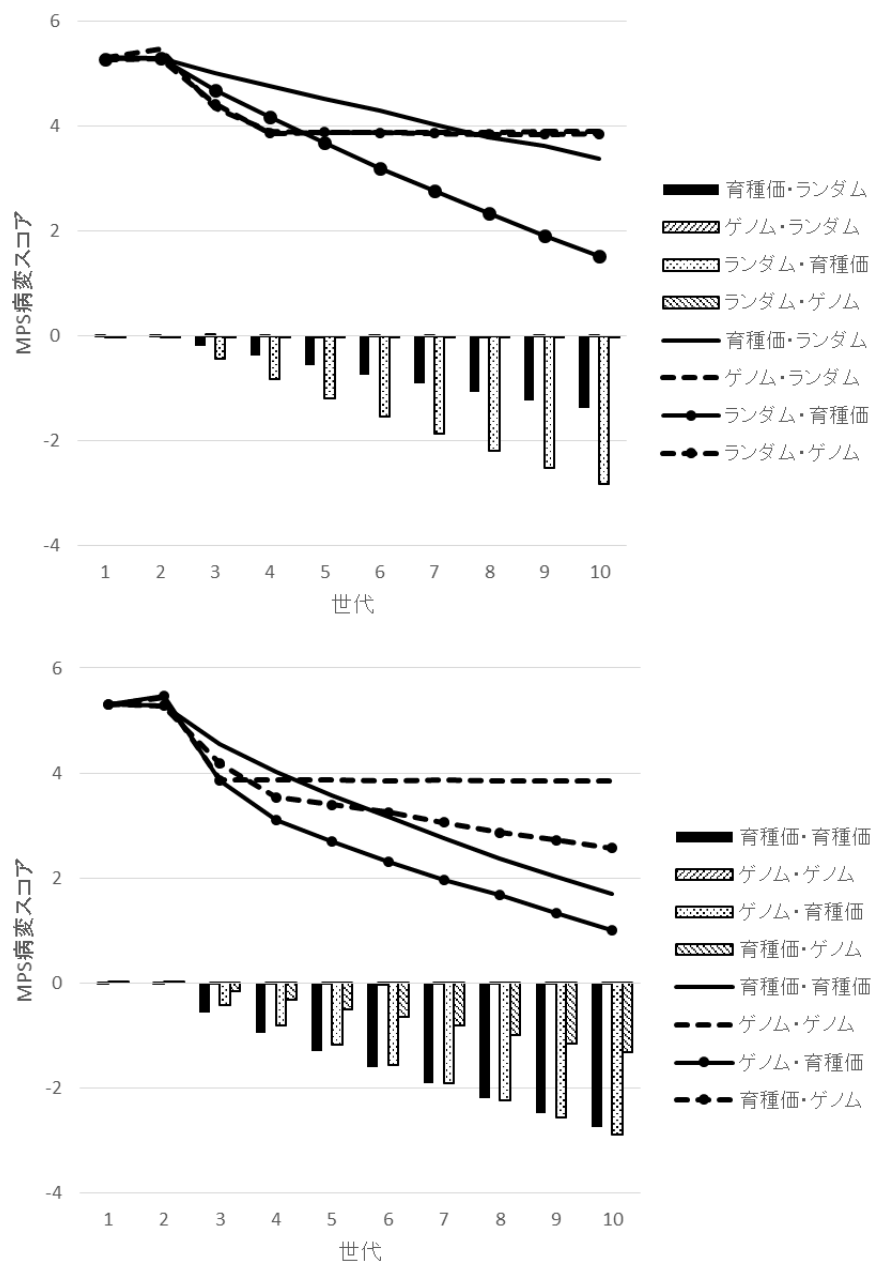


図 1(上図)、図 2 (下図)

各選抜シナリオにおける表型値の推移（折れ線グラフ）と真の育種価の推移（棒グラフ）

各シナリオは、MPS 病変スコアの推定育種価にもとづく選抜（育種価）と QTL の遺伝子型値をもとにした選抜（ゲノム）、ランダム選抜（ランダム）をそれぞれ予備選抜、本選抜に組み合わせたもの。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	岡村 俊宏
審査委員	主査：教授 佐藤 正寛 副査：教授 麻生 久 准教授 北澤 春樹 教授 鈴木 啓一（寄附講座）
学位論文 題目	末梢血免疫能およびゲノム情報を利用した豚マイコプラズマ性肺炎に対する抗病性育種手法の開発
論文審査の結果の要旨	
<p>家畜の抗病性育種は、慢性呼吸器病など疾病対策の一つの方策として重要である。宮城県畜産試験場では、豚ランドレース種を5世代にわたり選抜育種すること、豚マイコプラズマ性肺炎（MPS）に高い抵抗性を示す系統を造成した。しかし、病変形質の改良には、①測定に必要な屠畜にかかわるコストが大きいこと、②選抜候補個体を直接測定できないこと、③一般に遺伝率が低いことなどがネックとなり、これまで育種改良がなされてきた経済形質に比べて改良効率が低い。このような形質と遺伝的に関連性のある形質の情報を収集することができれば、改良形質における育種価の推定精度は向上する。</p> <p>本研究では、宮城県畜産試験場で造成された MPS に高い抵抗性を示すランドレース種集団を供試動物とし、改良のターゲットとなる病変形質と遺伝的関連性の高い形質の利用および病変形質を制御するゲノム領域に関する情報の利用について検討した。</p>	

<p>はじめに、免疫形質を利用した病変形質の効率的な改良手法を開発するため、豚ランドレース種集団から末梢血免疫形質を測定し、遺伝的パラメータを推定することにより、病変形質と免疫形質の遺伝的特性と遺伝的関連性を明らかにした。また、この情報をもとに MPS 病変スコアの選抜に有用な免疫形質の探索とその利用法について、コンピュータシミュレーションにより検討した。その結果、MPS 病変スコアの遺伝率は 0.07 と低い値が推定され、直接選抜による改良は効率的ではないことが示唆された。また、MPS 病変形質と遺伝相関の高いいくつかの免疫形質が明らかとなった。これらの免疫形質のうち、食細胞活性を選抜のターゲットとすることで、生産形質への悪影響の低減や近交度の抑制が可能であることなど、低コストで効率的な改良の可能性が示された。</p> <p>次に、MPS 病変スコアに影響するゲノム領域の探索およびそのゲノム情報の利用による MPS 病変スコアの改良の効率化について検討した。その結果、SNP マーカー ALGA0012286 が最も有意性の高いマーカーであることが明らかとなった。この SNP マーカーが説明する遺伝分散は、全遺伝分散の 29% に相当した。また、このマーカーを利用することにより、従来の BLUP 法による選抜よりも、選抜の初期において遺伝的改良量が大きく、5～7 世代で改良が実施される豚の系統造成において有用であることが明らかとなった。</p> <p>本研究で得られた成果は、抗病性育種をより効率的に進めるための手法を提案するものであり、MPS 病変を減少させる新たな育種手法として高く評価される。よって、審査員一同はこれを博士の学位に値するものと判定した。</p>
